

①⑨ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ Off nlegungsschrift  
⑪ DE 3835962 A1

⑳ Aktenzeichen: P 38 35 962.6  
㉑ Anmeldetag: 21. 10. 88  
㉒ Offenlegungstag: 1. 6. 89

⑤① Int. Cl. 4:  
C07K 13/00

C 07 K 7/06  
C 07 K 7/08  
C 07 K 7/10  
C 07 K 1/06  
C 07 K 1/10  
A 61 K 37/02  
A 01 N 37/02  
// C07K 3/14,3/20,  
3/22,3/24

DE 3835962 A1

Bestandteil

③① Unionspriorität: ③② ③③ ③①  
21.10.87 HU 4723/87

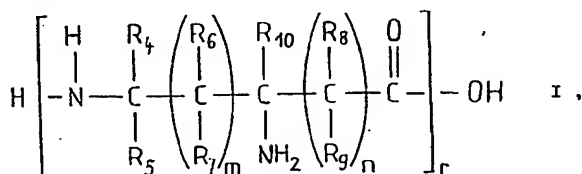
⑦① Anmelder:  
MTA Kutatás- és Szerveztelemző Intézet; MTA  
Növényvédelmi Kutatóintézet, Budapest, HU

⑦④ Vertreter:  
Beszédes, S., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat., Pat.-Anw., 8060  
Dachau

⑦② Erfinder:  
Gyula, Szókán, Dr.; Tyihák, Erno, Dr.; Szende, Béla;  
Lapis, Károly, Dr.; Gáborjányi, Richárd, Dr.; Almás,  
geb. Neuport, Márta, Budapest, HU

⑤④ Polysisodiaminocarbonsäuren, Verfahren zu ihrer Herstellung und diese enthaltende Arzneimittel und Pflanzenschutzmittel

Gegenstand der Erfindung sind Polysisodiaminocarbonsäuren der allgemeinen Formel



worin

R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub> und R<sub>10</sub> unabhängig voneinander für Wasserstoff beziehungsweise Alkylreste mit 1 bis 4 Kohlenstoffatom(en) stehen,  
r ein Durchschnittswert von 10 bis 400 ist,  
m eine Zahl von 0 bis 10 bedeutet und  
n eine Zahl von 0 bis 10 darstellt,  
sowie ihre Salze, optischen Isomere und Racemate.  
Gegenstand der Erfindung sind auch ein Verfahren zur Herstellung dieser Verbindungen sowie diese enthaltende Arzneimittel und Pflanzenschutzmittel.

DE 3835962 A1

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft neue Polyisodiaminocarbonsäuren, ein Verfahren zu ihrer Herstellung und diese Verbindungen enthaltende Arzneimittel, insbesondere mit tumorhemmender und antiviraler Wirkung, und Pflanzenschutzmittel, insbesondere zur Erhöhung der Resistenz der Pflanzen gegen Virusinfektionen.

In der Natur kommen auch aus Diaminomonomer-carbonsäuren aufgebaute, Isopeptidbindungen enthaltende Peptide, zum Beispiel in einigen Peptid-Antibiotika, in der Zellwand einiger Bakterien sowie in den Clavicepaminen, vor. Möglicherweise können die Polypeptide biologische Wirkungen ausüben und auch auf biologischem Wege hergestellt werden.

Von japanischen Forschern wurde festgestellt, daß der Mikroorganismus *Streptomyces albus* auch ein aus 25 bis 30 Monomereinheiten bestehendes L-Lysin-Polymer, worin die Monomere, durch Isopeptidbindungen verbunden sind, wie es nachgewiesen wurde, erzeugt (S. Shima und H. Sakai: Agric. Biol. Chem. 45, [1981], 2 503). Es wurde nachgewiesen, daß dieses natürliche  $\epsilon$ -Poly-L-lysin eine starke Bakteriophagen inaktivierende Wirkung ausübt (S. Shima und Mitarbeiter: Agric. Biol. Chem. 46, [1982], 1 917) und es wurde ein Gärverfahren zur Herstellung dieses Isopeptides ausgearbeitet (S. Shima und Mitarbeiter: Nippon Nogeikaku Kaishi 57, [1983], 221).

Vom humantherapeutischen Gesichtspunkt haben die aus dem saprophytischen Züchten des Mutterkornes [*Claviceps purpurea* — Fr. (Tul.)] isolierbaren basischen Eiweiße, die Clavicepamine, Bedeutung. Diese Eiweiße können zu Fraktionen mit Molekulargewichten von 2 000 bis 17 000, deren Lysingehalt hervorragend hoch (30 bis 90 Mol-%) ist, getrennt werden. Im Laufe früherer Untersuchungen wurde bestätigt, daß Eiweiße die Zellvermehrung und dadurch auch das Wachstum tierischer Tumoren praktisch ohne toxische Symptome hemmen (E. Thihák: Dissertation für Kandidatur, 1978). Durch die Strukturprüfung der isolierten lysinreichen Eiweiße wurde bewiesen, daß hier die  $\epsilon$ -Aminogruppen der L-Lysineinheiten in Peptidbindungen stehen (Gy. Szókán und Mitarbeiter: J. Chromatography 366, [1986], 283). Auf Grund der Schrifttumsangaben und eigener Untersuchungen ist es aber nicht bekannt, welche Rolle die Polyisolsin-Struktureinheiten in der günstigen biologischen Wirkung der Clavicepamine spielen.

Von indischen Forschern wurde die antivirale Wirkung von synthetischen Poly-L-isolsinen, deren mit Aminosäuren acylierten Derivaten sowie von synthetischer Poly- $\beta$ -L- $\alpha$ ,  $\beta$ -diaminopropionsäure untersucht. Es wurde bestätigt, daß diese Verbindungen keine unmittelbare Wirkung ausüben, sondern einen interferonartigen antiviralen Faktor, aber schwächer als Poly-L-lysin, induzieren (Indian J. Exper. Biology 20, [1987], 227; Indian J. Chem. 21B [1982], 483).

Zwecks Untersuchung der Zusammenhänge zwischen Struktur und biologischer Wirkung bestand das Bestreben, Isopeptide von Diaminocarbonsäuren mit einer Gliederanzahl von 10 bis 400, mit einem gegebenen durchschnittlichen Molekulargewicht und mit einer niedrigen Polydispersität in einer auch betriebsmäßig durchführbaren Weise herzustellen. Grundlegende Ansprüche an die herzustellenden Substanzen waren: Hoher Reinheitsgrad, geringes Streuen des Molekulargewichtes im Falle eines gegebenen Durchschnittswertes (niedrige Polydispersität) sowie die Einhaltung der vorgeplanten Konfiguration der Aminosäurereste. Es ist nämlich bekannt, daß die biologische Wirkung der Biopolymere durch ihre Molekulargewichtsverteilung stark beeinflusst wird. Während eigener früherer Untersuchungen wurde nachgewiesen, daß die biologische Wirkung von Aminosäuren und Polypeptiden durch ihre optische Konfiguration entscheidend beeinflusst wird. Die Moleküle von entgegengesetzten Konfigurationen können eine gegensätzliche Wirkung haben; dies wurde bei mehreren Aminosäuren beobachtet.

So wird zum Beispiel das Wachstum durchimpfbarer tierischer Tumoren durch das D-Arginin-Monomer gehemmt, durch das L-Arginin-Monomer aber stimuliert (B. Szende und E. Thihák: Lancet 7 456 [1968], 824; B. Szende: Dissertation für die Kandidatur, 1974). Demgemäß können die D- und L-Aminosäuren ihre Wirkung gegenseitig auslöschen, wenn sie in einem Racemagemisch oder in einem racemischen Polymer nebeneinander vorliegen.

Zur Herstellung der Polymere mit einer Ringgliederanzahl von 10 bis 400 schien ein synthetischer Weg, vor allem durch die Polymerisation von Monomeren, gangbar zu sein.

Die Bedeutung der in der Beschreibung verwendeten Abkürzungen werden gemäß der IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (J. Biol. Chem. 247 [1972], 977) nachstehend angegeben.

Z: Benzoyloxycarbonyl-Gruppe

Boc: tert-Butyloxycarbonyl-Gruppe

Np: p-Nitrophenyl-Gruppe

Su: N-Hydroxysuccinimido-Gruppe

Pcp: Pentachlorphenyl-Gruppe

Pfp: Pentafluorphenyl-Gruppe

Bt: N-Hydroxybenzotriazolyl-Gruppe

Bu<sup>t</sup>OCO: Isobutyloxycarbonyl-Gruppe

EtOCO: Ethyloxycarbonyl-Gruppe

N<sub>3</sub>: Azidogruppe

EEDQ: N-Ethyloxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydrochinoliny-Gruppe

IIDQ: N-Isobutyloxycarbonyl-2-isobutyl-1,2-dihydrochinoliny-Gruppe

THF: Tetrahydrofuran

DMF: Dimethylformamid

HPLC: Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie

OPLC: Überdruck-Dünnschichtchromatographie

IEF: Isoelektrisches Fokussieren

MS: Massenspektrometrie

NMR: Magnetische Kernresonanz-Spektroskopie

ZCO<sub>2</sub>: Z-Gruppe, gemessen aufgrund des Kohlendioxyds.

Durch die Anwendung des Verfahrens von Hull und Mitarbeitern (Biopolymers 17 [1978], 2 427) wurde ein Aktivester (-OPcp) von an der  $\alpha$ -Aminogruppe durch eine Z-Gruppe geschützten monomeren Lysin zu Isopoly-  
 lysin polykondensiert. Von Gangopadhyay und Mathur (Indian J. Chem. 21B [1982], 483) wurde ein Poly-( $\beta$ -L- $\alpha$ , $\beta$ -  
 diamino-propionsäure)-isopeptid durch Polykondensation des Pentachlorphenylesters des an der  $\alpha$ -Aminogrup-  
 pe eine Boc-Schutzgruppe aufweisenden Lysines hergestellt. Durch eine Z-Gruppe geschütztes Lysin wurde  
 gemäß Nishi und Mitarbeitern (Int. J. Biol. Macromol. 2 [1980], 53) mittels Diphenylphosphorylazid (DPPA)  
 polymerisiert.

Es wird bemerkt, daß die Verfasser der obigen Mitteilungen keine Angaben über das Molekulargewicht, die  
 Molekulargewichtsverteilung und die optische Reinheit ihrer Produkte mitgeteilt hatten. Eigene Erfahrungen  
 haben gezeigt, daß — im Vergleich zur eigenen Zielsetzung — nur Polyisolysine mit einem niedrigen Molekular-  
 gewicht (mit einer Gliederanzahl von 15 bis 20, das heißt mit einem Molekulargewicht von höchstens 2 500)  
 gewonnen wurden. Die papierchromatographische Prüfung der Produkte zeigte, daß sie stark polydispers waren  
 und die Ausbeute unter Berücksichtigung der praktischen Gesichtspunkte niedrig blieb. Bei eigenen biologischen  
 Untersuchungen erwiesen sich diese Produkte als unwirksam.

Zur Herstellung von Polymeren mit einer niedrigen Polydispersität schienen die Verfahren von Kushwaha  
 und Mitarbeitern (Biopolymers 19 [1980] 219) und die von Mathur und Mitarbeitern (Int. J. Peptide Protein Res.  
 17 [1981], 189) als am besten geeignet zu sein. In der erstgenannten Literaturstelle ist die Herstellung von  
 $\epsilon$ -Polylysin und in der letztgenannten die des  $\delta$ -Polyornithines beschrieben. Das Grundprinzip beider Verfahren  
 ist wie folgt. Ein Tripeptid-methylester wird aus einem geeignet geschützten Aminosäure-methylester mit einem  
 geschützten Aktivester oder Azid hergestellt und dessen Carboxylgruppe wird durch alkalische Hydrolyse  
 freigesetzt und in ein aktiviertes Derivat, zum Beispiel einen Pentachlorphenylester, umgewandelt. Durch  
 Entfernen der endständigen  $\omega$ -NH<sub>2</sub>-Schutzgruppe wird ein zur Polykondensation geeignetes aktiviertes Tripep-  
 tid gewonnen. Nach der Polykondensation werden die  $\alpha$ -Aminogruppen freigesetzt und das Isopolypeptid wird  
 gewonnen. In den genannten Verfahren werden eine Boc-Schutzgruppe in der  $\alpha$ -Stellung und eine Z-Schutz-  
 gruppe in der  $\omega$ -Stellung verwendet; die letztere wird durch katalytisches Hydrieren entfernt. In diesen Veröf-  
 fentlichungen wurden das Molekulargewicht, die Polydispersität und die optische Reinheit (L- und D-Konfigura-  
 tion) der Endprodukte nicht charakterisiert.

Während der Reproduktion wurde ein bedeutender Nachteil der beiden letztgenannten Verfahren festgestellt.  
 Dieser besteht darin, daß im Laufe der Herstellung des Oligomers die an der Reaktion nicht teilnehmende  
 Carboxylgruppe in der Form ihres Methylesters geschützt wird und deshalb das so erhaltene Oligomer für eine  
 unmittelbare Polykondensation ungeeignet ist. Zur Bildung des aktivierten Derivates ist die Carboxylgruppe  
 durch alkalische Hydrolyse freizusetzen und dieser Schritt führt mit hoher Wahrscheinlichkeit zu einer nachteil-  
 igen Racemisierung, zur Verringerung der Ausbeute und zu unerwünschten Nebenreaktionen. Gleichzeitig  
 weisen die so gewonnenen Polymere eine starke Polydispersität auf. Weiterhin sind auch die Verwendung der  
 Z-Schutzgruppe in der  $\omega$ -Stellung und die Entfernung dieser Gruppe durch katalytisches Hydrieren nachteilig.

Die durch die letztgenannten Verfahren gewonnenen Polyisolysine erwiesen sich in eigenen biologischen  
 Untersuchungen als unwirksam.

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, unter Behebung der Nachteile des Standes der Technik neue  
 Isopolypeptide, welche ein bestimmtes Molekulargewicht und eine niedrige Polydispersität haben und aus  
 Diaminocarbonsäuren mit einer bestimmten (D- oder L-)Konfiguration aufgebaut sind, mit überlegenen phar-  
 makologischen, insbesondere tumorhemmenden und antiviralen, Wirkungen sowie ein Verfahren zu deren  
 Herstellung und diese Verbindungen enthaltende Arzneimittel zu schaffen.

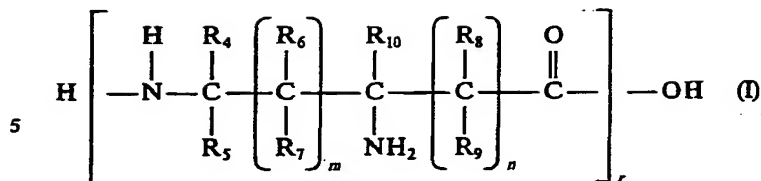
Das Obige wurde überraschenderweise durch die Erfindung erreicht.

Die Erfindung beruht auf der überraschenden Feststellung, daß das Obige erreicht werden kann, wenn zuerst  
 zur Polykondensation unmittelbar geeignete, aus Diaminomonocarbonsäuren aufgebaute aktivierte Monomere  
 oder Oligomere in der Weise hergestellt werden, daß die Carboxylgruppe der Ausgangssubstanzen mittels einer  
 Aktivestergruppe geschützt und die Peptidkoppelung mittels eines Verfahrens unter dessen Bedingungen das  
 eine Säureamidbindung bildende, an der Carboxylgruppe aktivierte Derivat mit der Aminkomponente mit einer  
 wesentlich höheren Geschwindigkeit reagiert als die Geschwindigkeit der Aminolyse der Aktivester-Schutz-  
 gruppe, durchgeführt wird.

Weiterhin beruht die Erfindung auf der überraschenden Feststellung, daß im Falle der Diaminomonocarbon-  
 säuren die p-Nitrophenylestergruppe zum vorübergehenden Schutz und zur gleichzeitigen Aktivierung der  
 Carboxylgruppe und das Verfahren der gemischten Anhydride zur Ausbildung der Peptidbindung sehr geeignet  
 sind und zweckmäßig die an der Säureamidbindung teilnehmende Aminogruppe durch eine Boc-Gruppe und die  
 an der Reaktion nicht teilnehmende Aminogruppe durch eine Z-Gruppe geschützt werden.

Schließlich beruht die Erfindung auf der überraschenden Feststellung, daß die Homoisepeptide der Sequenz-  
 Isopeptide, das heißt die aus identischen und homologen Aminosäuren bestehenden Isopeptide irgendeiner  
 Diaminocarbonsäure mittels des obigen Verfahrens in der Weise hergestellt werden können, daß die Aminosäu-  
 rereste ihre ursprüngliche (L- oder D-) Konfiguration beibehalten.

Gegenstand der Erfindung sind Polyisodiamincarbonsäuren der allgemeinen Formel



- 10 worin  
 R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub> und R<sub>10</sub> unabhängig voneinander für Wasserstoff beziehungsweise Alkylreste mit 1 bis 4 Kohlenstoffatom(en) stehen,  
 r ein Durchschnittswert von 10 bis 400 ist,  
 m eine Zahl von 0 bis 10 bedeutet und  
 15 n eine Zahl von 0 bis 10 darstellt,  
 sowie ihre Salze, optischen Isomere und Racemate.

Die Bedeutungen der entsprechenden Substituierten in den einzelnen Gliedern können also gleich oder verschieden sein.

Vorzugsweise ist m eine Zahl von 0 bis 3, insbesondere 2 oder 3, und/oder bedeutet

20 n 0.

Es ist auch bevorzugt, daß der beziehungsweise die Alkylrest(e), für welche[n] R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>, R<sub>9</sub>, und/oder R<sub>10</sub> stehen kann beziehungsweise können, [ein] solche[r] mit 1 oder 2, insbesondere 1 Kohlenstoffatom(en) ist beziehungsweise sind.

Ferner ist es bevorzugt, daß r eine Zahl von 40 bis 200 bedeutet.

25 Es ist auch bevorzugt, daß die erfindungsgemäßen Polyisodiaminocarbonsäuren die L-Konfiguration haben.

Weiterhin ist es bevorzugt, daß R<sub>8</sub> und R<sub>9</sub> Wasserstoffatome bedeuten. Besonders bevorzugt stehen darüber hinaus auch R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub> und R<sub>10</sub> für Wasserstoffatome.

30 Eine bevorzugte Gruppe der erfindungsgemäßen Polyisodiaminocarbonsäuren sind solche, bei welchen R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub> und R<sub>10</sub> voneinander unabhängig Wasserstoff beziehungsweise Alkylreste mit 1 bis 4 Kohlenstoffatom(en) bedeuten, R<sub>8</sub> und R<sub>9</sub> für Wasserstoff stehen, r eine Zahl von 40 bis 200 bedeutet, m 3 darstellt und n 0 ist. Von diesen Substanzen sind solche besonders bevorzugt, bei welchen R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub> und R<sub>10</sub> Wasserstoff bedeuten und r eine Zahl von 80 bis 120 ist.

35 Eine weitere bevorzugte Gruppe der erfindungsgemäßen Polyisodiaminocarbonsäuren sind solche, bei welchen R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub> und R<sub>10</sub> voneinander unabhängig Wasserstoff beziehungsweise Alkylreste mit 1 bis 4 Kohlenstoffatom(en) bedeuten, R<sub>8</sub> und R<sub>9</sub> für Wasserstoffatome stehen, r eine Zahl von 10 bis 120 bedeutet, m 2 darstellt und n 0 ist.

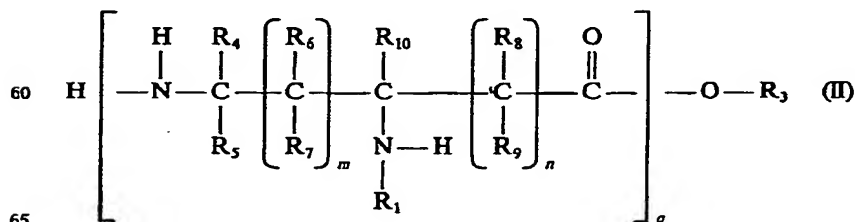
40 Eine bevorzugte Gruppe der erfindungsgemäßen Polyisodiaminocarbonsäuren sind solche, bei welchen R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub> und R<sub>10</sub> voneinander unabhängig Wasserstoff beziehungsweise Alkylreste mit 1 bis 4 Kohlenstoffatom(en) Polyisodiaminsäuren bedeuten, R<sub>8</sub> und R<sub>9</sub> für Wasserstoffatome stehen, r eine Zahl von 10 bis 400 bedeutet, m 1 darstellt und n 0 ist.

45 Eine noch weitere bevorzugte Gruppe der erfindungsgemäßen Polyisodiaminocarbonsäuren sind solche, bei welchen R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub> und R<sub>10</sub> voneinander unabhängig Wasserstoff beziehungsweise Alkylreste mit 1 bis 4 Kohlenstoffatom(en) bedeuten. R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub> und R<sub>9</sub> jeweils für Wasserstoffatome stehen, r eine Zahl von 10 bis 400 bedeutet sowie m und n 0 sind.

Die Salze der erfindungsgemäßen Polyisodiaminocarbonsäuren sind zweckmäßig solche mit pharmazeutisch brauchbaren Säuren. Beispiele sind Säureadditionssalze, wie Hydrochloride, Hydrobromide, Hydrojodide, Sulfate, Phosphate, Nitrate, Oxalate, Fumarate, Gluconate, Tartrate, Maleate, Acetate, Citrate, Benzoate, Ascorbate, Lactate und Alginat.

50 Besonders bevorzugte erfindungsgemäße Polyisodiaminocarbonsäuren sind Polyisolsyn mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 5 500 bis 25 600 Dalton, insbesondere 5 500 bis 22 500 Dalton, ganz besonders 10 200 bis 15 400 Dalton, und Polyisornithin mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 4 400 bis 13 500 Dalton.

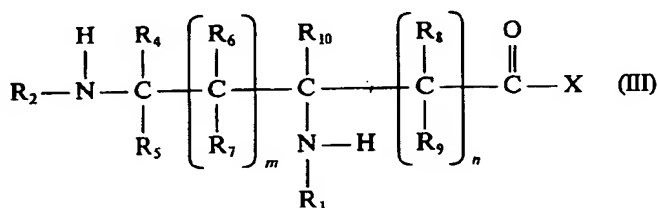
55 Gegenstand der Erfindung ist auch ein Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Verbindungen, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß geschützte Monomere oder Oligomere mit [einer] Diaminosäureinheit(en) der allgemeinen Formel



65 worin

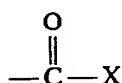
q eine Zahl von 1 bis 9 bedeutet,

$R_1$  für eine Aminoschutzgruppe steht und in Oligomeren in einer jeden Oligomereinheit gleich ist,  
 $-O-R_3$  für eine dem Schutz und der gleichzeitigen Aktivierung der Carboxylgruppe dienende Aktivester-Schutzgruppe steht,  
 $R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9, R_{10}, m$  und  $n$  die oben angegebenen Bedeutungen haben,  
 wobei im Falle von Oligomeren die Bedeutungen der Substituenten in den einzelnen Gliedern gleich oder verschieden sind, mit geschützten monomeren Diaminosäurederivaten der allgemeinen Formel

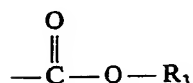


worin

$R_2$  für eine von  $R_1$  verschiedene, gegenüber  $R_1$  selektiv entfernbare Aminoschutzgruppe steht,  
 $X$  eine zur Aktivierung der Carboxylgruppe dienende Gruppe mit der Maßgabe, daß die Gruppe der allgemeinen Formel

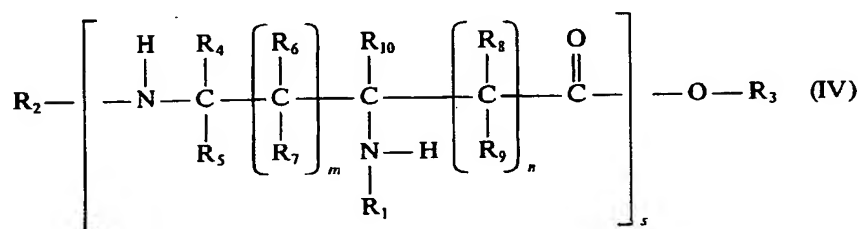


reaktionsfähiger als die Gruppe der allgemeinen Formel



ist, bedeutet und

$R_1, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9, R_{10}, m$  und  $n$  die vorstehend angegebenen Bedeutungen haben,  
 umgesetzt werden, aus den so erhaltenen geschützten Oligo- beziehungsweise Polyisodiaminocarbonsäuren der allgemeinen Formel



worin

$R_1, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9, R_{10}, m$  und  $n$  die vorstehend angegebenen Bedeutungen haben und  
 $s$  eine ganze Zahl von 2 bis 10 ist,

die Aminoschutzgruppe  $R_2$  abgespalten wird und aus den erhaltenen geschützten Oligo- beziehungsweise Polyisodiaminocarbonsäuren, im Falle daß  $s$  2 bis 9 bedeutet, nach ihrem Umsetzen mit geschützten monomeren Diaminosäurederivaten der allgemeinen Formel III und/oder Polykondensieren die Schutzgruppen  $R_1$  abgespalten werden, worauf in an sich bekannter Weise gegebenenfalls die erhaltenen Polyisodiaminocarbonsäuren der allgemeinen Formel I in Säureadditionssalze überführt werden beziehungsweise gegebenenfalls die erhaltenen Säureadditionssalze der Polyisodiaminocarbonsäuren der allgemeinen Formel I in die freien Polyisodiaminocarbonsäuren oder in andere Säureadditionssalze überführt werden und/oder gegebenenfalls eine Spaltung der erhaltenen racemischen Polyisodiaminocarbonsäuren der allgemeinen Formel I beziehungsweise Salze derselben in ihre optisch aktiven Antipoden beziehungsweise eine Racemisierung der entsprechenden optisch aktiven Verbindungen vorgenommen wird.

Vorzugsweise bedeuten von den für in der Peptidchemie bekannte, voneinander abweichende, selektiv entfernbare Aminoschutzgruppen stehenden  $R_1$  und  $R_2$   $R_1$  eine Z-Gruppe und  $R_2$  eine Boc-Gruppe.

Es ist bevorzugt, als Aktivester-Schutzgruppe, für welche  $-O-R_3$  steht, eine Gruppe  $-ONp$ ,  $-OSu$ ,  $-OPcp$ ,  $-OPfp$  oder  $-OBt$  zu verwenden.

Zweckmäßig wird als zur Aktivierung der Carboxylgruppe dienende Gruppe, für die  $X$  steht, eine Gruppe  $Bu^tOCO-$ ,  $EtOCO-$ ,  $N_3-$ ,  $-OSu$ ,  $OPcp$  oder  $-OPfp$  je nach den Reaktionsbedingungen und der Bedeutung

von R<sub>3</sub> verwendet. Bevorzugte Bedeutungen von X sind die Gruppen Bu<sup>i</sup>OCO- und EtOCO.

Nach einer zweckmäßigen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Herstellung von Polyisodiaminocarbonsäuren der allgemeinen Formel I,

bei welchen

5 *m* 3 bedeutet und

*n* 0 ist,

werden als geschützte Monomere der Oligomere mit [einer] Diaminosäureeinheit(en) der allgemeinen Formel II solche,

bei welchen

10 *m* 3 bedeutet und

*n* 0 ist,

eingesetzt und als geschützte monomere Diaminosäurederivate der allgemeinen Formel III solche, bei welchen

*m* 3 bedeutet und

*n* 0 ist,

15 verwendet.

Nach einer weiteren zweckmäßigen Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Herstellung von Polyisodiaminocarbonsäuren der allgemeinen Formel I,

bei welchen

*m* 2 bedeutet und

20 *n* 0 ist,

werden als geschützte Monomere oder Oligomere mit [einer] Diaminosäureeinheit(en) der allgemeinen Formel II solche,

bei welchen

*m* 2 bedeutet und

25 *n* 0 ist,

eingesetzt und als geschützte monomere Diaminosäurederivate der allgemeinen Formel III solche,

bei welchen

*m* 2 bedeutet und

*n* 0 ist,

30 verwendet.

Nach der am meisten bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden als Ausgangssubstanzen Monomere der allgemeinen Formel III, bei welchen R<sub>1</sub> eine Z-Gruppe bedeutet, R<sub>2</sub> für Boc steht und —O—R<sub>3</sub> eine —ONp-Gruppe ist, verwendet. Es werden die Boc-Schutzgruppe in an sich bekannter Weise, vorzugsweise durch Acidolyse, abgespalten und dann als Schutzgruppen R<sub>1</sub> = Z und R<sub>2</sub> = Boc aufweisende Diaminosäurederivate der allgemeinen Formel III nach der Verfahrensweise der gemischten Anhydride angekoppelt. Die so erhaltenen Dipeptide können nach dem Entfernen der Boc-Schutzgruppe zu den Polyisodiaminocarbonsäuren mit der gewünschten Gliederanzahl polykondensiert werden oder vorzugsweise durch Ankoppeln einer weiteren geschützten Aminosäure höchstens in Dekapeptide, am meisten bevorzugt in Tripeptide, umgewandelt und dann die erhaltenen Oligomere zweckmäßig durch Polykondensation in die Polyisodiaminocarbonsäuren mit der gewünschten Gliederanzahl überführt werden. Von dem letzteren werden die  $\alpha$ -Z-Schutzgruppen mit Bromwasserstoff in Eisessig abgespalten und das Endprodukt wird isoliert.

Die optischen Isomere der Polyisodiaminocarbonsäuren werden zweckmäßig in der Weise hergestellt, daß die entsprechenden Isomere als Ausgangsstoffe verwendet werden. Wenn racemische Polyisodiaminocarbonsäuren herzustellen sind, werden zweckmäßig die Racemate der Monomere als Ausgangssubstanzen verwendet.

45 Nach einer speziellen bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird als geschütztes Monomer mit [einer] Diaminosäureeinheit(en) der allgemeinen Formel II N <sup>$\alpha$</sup> -Z-L-Lysin-p-nitrophenylesterhydrochlorid und als geschütztes monomeres Diaminosäurederivat der allgemeinen Formel III ein gemischtes Anhydrid, welches aus N <sup>$\alpha$</sup> -Z-N <sup>$\epsilon$</sup> -Boc-L-lysin mit Isobutyl-chlorformiat erhalten worden ist, verwendet.

50 Nach einer anderen speziellen bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird als geschütztes Monomer mit [einer] Diaminosäureeinheit(en) der allgemeinen Formel II N <sup>$\alpha$</sup> -Z-L-Ornithin-p-nitrophenylesterhydrochlorid und als geschütztes monomeres Diaminosäurederivat der allgemeinen Formel III ein gemischtes Anhydrid, welches aus N <sup>$\alpha$</sup> -Z-N <sup>$\beta$</sup> -Boc-L-Ornithin mit Isobutyl-chlorformiat erhalten worden ist, verwendet.

55 Nach einer weiteren speziellen bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird als geschütztes Monomer mit [einer] Diaminosäureeinheit(en) der allgemeinen Formel II N <sup>$\alpha$</sup> -Z-D-Lysin-p-nitrophenylesterhydrochlorid und als geschütztes monomeres Diaminosäurederivat der allgemeinen Formel III ein gemischtes Anhydrid, welches aus N <sup>$\alpha$</sup> -Z-N <sup>$\epsilon$</sup> -Boc-D-Lysin mit Isobutyl-chlorformiat erhalten worden ist, verwendet.

60 Nach einer noch weiteren speziellen bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird als geschütztes Monomer mit [einer] Diaminosäureeinheit(en) der allgemeinen Formel II N <sup>$\alpha$</sup> -Z-D-Ornithin-p-nitrophenylesterhydrochlorid und als geschütztes monomeres Diaminosäurederivat der allgemeinen Formel III ein gemischtes Anhydrid, welches aus N <sup>$\alpha$</sup> -Z-N <sup>$\beta$</sup> -Boc-D-Ornithin mit Isobutyl-chlorformiat erhalten worden ist, verwendet.

65 Durch die systematische Untersuchung der sich als am meisten bevorzugt erwiesenen Kopplungsverfahrensweise, das heißt der Verfahrensweise der gemischten Anhydride, wurden die folgenden Reaktionsbedingungen als am besten geeignet festgestellt:

a) Lösungsmittel: Acetonitril, THF, DMF oder Dichlormethan.

- b) Anhydridbildendes Reagens: Ethyl- oder Isobutyl-chlorformiat, EEDQ, IIDQ in Gegenwart einer tertiären Base, zum Beispiel von Triethylamin, Diisopropylethylamin oder N-Methylmorpholin.  
 c) Aktivierungszeit und -temperatur: 10 bis 30 Minuten bei Temperaturen von  $-10^{\circ}\text{C}$  bis  $-20^{\circ}\text{C}$ .  
 d) Freisetzung der Aminkomponente aus ihrem Salz mit Triethylamin oder Diisopropylamin in dem Reaktionsgemisch.

In dieser Weise wurden die reinen Endprodukte in durchschnittlichen Ausbeuten von 60 bis 80% gewonnen.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren können aus Diaminocarbonsäuren mit sowohl L- als auch D-Konfiguration aufgebaute Homo- und Sequenz-Polyisodiaminocarbonsäuren [Homo- und Sequenz-Isopeptide] unter Beibehalten der ursprünglichen Konfiguration der Ausgangsstoffe hergestellt werden.

Zur Analyse der hergestellten Polyisodiaminocarbonsäuren wurden moderne trennungstechnische Verfahrenswesen (zum Beispiel HPLC, OPLC, IEF) und Strukturaufklärungsverfahrenswesen (zum Beispiel MS, NMR) verwendet. Durch diese Untersuchungsverfahrenswesen wurde das Gelingen der Herstellung der gewünschten Substanzen gefördert.

Zu den biologischen Studien wurden die in der in den Beispielen beschriebenen Weise gereinigten Produkte verwendet. Erforderlichenfalls wurde die Reinigung durch gewöhnliche andere Arbeitsgänge, zum Beispiel Säulenchromatographie und Gelchromatographie, ergänzt.

Im Vergleich zu den von Kushwaha bzw. Mathur sowie von Hull an den oben genannten Schriftumsstellen mitgeteilten Synthesen sind die Vorteile des erfindungsgemäßen Verfahrens zusammengefaßt wie folgt:

- A) Es können Produkte mit einer günstigen biologischen Wirkung reproduzierbar hergestellt werden.  
 B) Ein zur Polykondensation unmittelbar geeignetes Oligomer wird in der Weise erhalten, daß der bei den bekannten Verfahren oben erwähnte Schritt der Hydrolyse vermieden wird, wodurch die Racemisierung vermieden wird, was hinsichtlich der biologischen Wirkung entscheidend ist.  
 C) Es können Produkte mit bestimmten durchschnittlichen Molekulargewichten innerhalb weiter Grenzen, deren Molekulargewichtsverteilung überraschend günstig (wenig polydispers) ist, hergestellt werden, was auch wegen des Erreichens der gewünschten biologischen Wirkung günstig ist. Demgemäß sind die Daten des durch Ultrazentrifugieren gemessenen Molekulargewichtes der erfindungsgemäßen Substanz Polyiso-L-lysin-hydrobromid [SZTP-14] wie folgt: Molekulargewicht:  $12\,700 \pm 200$ ; Polydispersität, das heißt

$$\frac{\text{Anzahlsdurchschnitt}}{\text{Gewichtsdurchschnitt}} = 3,7.$$

D) Es wird eine höhere Ausbeute erreicht und die optische Reinheit der Zwischenprodukte und Endprodukte ist höher. Sowohl die Zwischenprodukte als auch die Endprodukte sind gut kristallisierbare und deshalb leicht isolierbare Substanzen.

E) Die einzelnen Schritte der Peptidkopplung gehen während einer bedeutend kürzeren Zeit vonstatten.

F) Durch die Amino-Schutzgruppe-Kombination, die in der als günstigst festgestellten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens verwendet wird, kann die durch katalytisches Hydrieren durchgeführte Freisetzung der an der Säureamidbindung teilnehmenden Aminogruppe vermieden werden. Das ist hinsichtlich einer technischen beziehungsweise industriellen Durchführung günstig.

G) Ein wesentlicher Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht darin, daß, wenn von optisch reinen Isomeren ausgegangen wird, das Polymer mit der entsprechenden Konfiguration gewonnen wird. Dieser Vorteil ergibt sich aus den günstig gewählten Schritten der Synthese.

Wie oben erwähnt wurde, wurden bei Anwendung der oben geschilderten bekannten Verfahren unwirksame Produkte erhalten. Das ist vor allem der Polydispersität des Endproduktes sowie — im Falle der Verfahren von Kushwaha beziehungsweise Mathur — der Racemisierung des Endproduktes, die bei der Synthese des für die Polykondensation geeigneten Oligomers eintritt, zuzuschreiben. Im Gegensatz dazu können erfindungsgemäß Substanzen mit überraschend günstigen biologischen Eigenschaften erhalten werden, wie es im folgenden näher veranschaulicht wird.

Gegenstand der Erfindung sind auch Arzneimittel, welche durch einen Gehalt an 1 oder mehr erfindungsgemäßen Verbindung(en) als Wirkstoff(e), gegebenenfalls zusammen mit 1 oder mehr üblichen pharmazeutischen Träger- und/oder Hilfsstoff(en), gekennzeichnet sind.

Die erfindungsgemäßen Polyisodiaminocarbonsäuren haben nämlich wie bereits gesagt wertvolle pharmakologische, insbesondere tumorhemmende und antivirale Wirkungen, wie Resistenz gegen Virusinfektionen.

Besonders ausgeprägt sind diese bei denen mit L-Konfiguration.

Gegenstand der Erfindung sind auch Pflanzenschutzmittel, insbesondere zur Erhöhung der Resistenz von Pflanzen gegen Virusinfektionen, welche durch einen Gehalt an 1 oder mehr erfindungsgemäßen Verbindungen, gegebenenfalls zusammen mit 1 oder mehr in Pflanzenschutzmitteln üblichen Träger- und/oder Hilfsstoff(en), gekennzeichnet sind.

Die erfindungsgemäßen Polyisodiaminocarbonsäuren haben nämlich auch wertvolle Pflanzenschutzmittelwirkungen, insbesondere antivirale Wirkungen.

Die biologische Wirkung der erfindungsgemäßen Verbindungen wurde unter in vitro und in vivo Bedingungen geprüft.

Die Ergebnisse werden nachstehend zusammengefaßt. Die tumorhemmende Wirkung wurde an tierischen



Tumorstämmen, die antivirale Wirkung unter Verwendung eines pflanzlichen Virus studiert.

In den Versuchen erwiesen sich die Polyiso-L-Lysine mit einer Gliederanzahl von 40 bis 200 (mit einem Molekulargewicht von 5 500 bis 25 600) als besonders wirksam; eine hervorragend gute Wirkung übten die Produkte mit einer Gliederanzahl von 80 bis 120 (mit einem Molekulargewicht zwischen 10 200 und 15 400) aus.

#### Prüfung der tumorhemmenden Wirkung

Die Prüfung der Wirkung der die Zellproliferation beeinflussenden Verbindungen geschah im allgemeinen in vivo unter Verwendung von Zellkulturen und in vivo unter Verwendung durchimpfbarer tierischer Tumoren. Deshalb wurden die Prüfsubstanzen an einer menschlichen Erythroleukämie-Zellkultur (K-562) (Ursprung: Karolinska Institut, Stockholm) und an vier durchimpfbaren Maustumoren (L<sub>1210</sub> lymphoide Leukämie, P<sub>388</sub> Tumor macrophagen Ursprungs, Ehrlich-Karzinom und Lewis-Lungenkarzinom) geprüft. Im Falle der L<sub>1210</sub>, P<sub>388</sub> und Ehrlich-Tumoren diente das Überleben der Tiere als Parameter, während im Falle des Lewis-Lungenkarzinoms die Anzahl und Größe der durch den Tumor herbeigeführten Lungen- und Lebermetastasen in den behandelten Tieren und in den unbehandelten Kontrolltieren bestimmt wurden. Zu diesen Versuchen wurde eine Injektionslösung verwendet, die 50 mg Prüfsubstanz in 10 ml physiologischer Kochsalzlösung enthielt und steril filtriert wurde.

Die Prüfsubstanzen wurden wie folgt markiert:

Prüfsubstanz	Molekulargewicht für die freie Base berechnet
--------------	---

Die erfindungsgemäßen Polyiso-L-lysine (SZTP-Verbindungen)

SZTP-14: Polyiso-L-lysin-hydrobromid	12 700 ± 200*
SZTP-15: Polyiso-L-lysin-hydrobromid	11 600 ± 200
SZTP-16: Polyiso-L-lysin-hydrobromid	13 400 ± 200
SZTP-17: Polyiso-L-lysin-hydrobromid	14 500 ± 200
SZTP-18: das erfindungsgemäße Polyiso-L-ornithin-hydrobromid	8 900 ± 200
H-17: das mit Hilfe des Verfahrens von Hull und Mitarb. hergestellte Polyisolyisin	
K-17: das mit Hilfe des Verfahrens von Kushwaha und Mitarb. hergestellte Polyisolyisin	
A-3: α-Polylysin	

\* Polydispersität, d. h.  $\frac{\text{Anzahlsdurchschnitt}}{\text{Gewichtsdurchschnitt}} = 3,7$  Ergebnisse der Untersuchung der Tumorzellproliferation

Es wurde bestätigt, daß sich die Anzahl der Tumorzellen in vitro unter der Wirkung der Behandlung mit den erfindungsgemäßen Verbindungen im Vergleich zu der Kontrolle dosisabhängig verminderte. Das erwies sich in einem Stagnieren der Zellenanzahl im Falle kleinerer Dosen und in der Zerstörung der Zellen im Falle höherer Dosen. Die Substanzen K-17 und H-17 waren unwirksam, und α-Polylysin (Substanz A-3) löste nur eine Stagnierung der Zellenanzahl aus.

Aufgrund der in vivo Untersuchungen ergab die Behandlung mit SZTP-Substanzen die Verlängerung der Lebensdauer der behandelten Tiere im Falle der Tumoren L<sub>1210</sub> und P<sub>388</sub>. Im Falle des Ehrlich-Tumors wurde eine sehr lange tumorfreie Periode durch die Behandlung erreicht und das Tumorwachstum wurde nur nach Unterbrechung der Behandlung beobachtet.

Die Metastasenbildung des Lewis-Lungentumors wurde durch die SZTP-Substanzen derart beeinflußt, daß die Ausgestaltung von Lebermetastasen nach einem in die Milz geimpften primären Tumors völlig gehemmt und die Bildung von Lungenmetastasen nach einem in den Muskel geimpften primären Tumors bedeutend vermindert wurden.

Demgemäß erwiesen sich die erfindungsgemäßen Polyisolyisine und Polyisoornithine als tumorzellproliferationshemmende Verbindungen, unter denen Polyisolyisine eine ganz besonders günstige Wirkung aufwiesen. Hinsichtlich des Überlebens der Tiere ist ihre tumorhemmende Wirkung mit der Wirkung der besten bekannten Cytostatika vergleichbar; es ist besonders hervorzuheben, daß sie eine unerwartet günstige hemmende Wirkung auf die Bildung von Metastasen ausüben. Ein weiterer Vorteil dieser Verbindungen im Vergleich zu den bekannten Cytostatika besteht darin, daß ihre Toxizität viel niedriger ist, als die der gegenwärtig verwendeten Cytostatika.

Durch die biologischen Prüfungen wurde festgestellt, daß der therapeutische Index der SZTP-Verbindungen, d. h. der Quotient LD<sub>50</sub>/wirksame Mindestdosis über 10 liegt, während dieser Wert bei den meisten bekannten Cytostatika unter 10 ist.

Hinsichtlich der biologischen Wirkungen zeigte sich kein Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Tieren, was auch als günstig anzusehen ist.

Die tumorzellproliferationshemmende Wirkung wird durch die nachstehenden Angaben veranschaulicht.



## In vitro Prüfungen

Tabelle 1a, 1b und 1c geben die Wirkung der Behandlung mit den mittels verschiedener Verfahren hergestellten Polyiso-L-lysinen, mit dem erfindungsgemäßen Polyiso-L-ornithin und mit dem  $\alpha$ -Polylysin auf die Proliferation der K-562-Zellen.

Die Parameter dieser Prüfungen waren wie folgt:

Zellen: Die K-562 Zellenlinie der humanen Erythroleukämie (Ursprung: Karolinska Institut, Stockholm) wurde verwendet.

Zellenanzahl:  $5 \times 10^4$ /ml; 5 ml in jedem Reagenzglas.

Anzahl der Proben: 3 Reagenzgläser für jede Dosis.

Medium: M-199-Medium (Parker-Medium) mit 10 Gew.-% Kalbsmolke (Flow Laboratories, Irvine, Scotland).

Temperatur und Atmosphäre: 37°C; Gemisch von 95 Vol.-% Luft und 5 Vol.-% Kohlendioxid.

Behandlung: 24 Stunden nach Verdünnung der Kulturen.

Auswertung: Zählung der Zellen 24, 48, 72 und 96 Stunden nach Verdünnung in einer Buerker-Kammer.

Anzahl der Versuche: 2 mit jeder Substanz.

Dosis: 1-10-100 µg/ml

Aus der Tabelle 1a ist ersichtlich, daß eine bedeutende dosisabhängige Proliferationshemmung eintrat. Es ist beachtenswert, daß eine Proliferationshemmung schon in einer Konzentration von 1 µg/ml beobachtet werden konnte.

Tabelle 1b zeigte, daß — im Gegensatz zu den Obigen — die Proliferation der K-562 Zellen durch die Substanzen H-17 und K-17 nicht gehemmt wurde.

Aus der Tabelle 1c geht hervor, daß  $\alpha$ -Polylysin eine Stagnation der Zellenanzahl im Vergleich zur Kontrolle ergab, aber auch in einer höheren Konzentration (100 µg/ml) keine Verminderung der Zellenanzahl auslöste.

Die in den Tabellen dargestellten Werte bedeuten die in den einzelnen Zeitpunkten beobachtete Zellenanzahl. Die Zellen wurden im Falle aller drei Dosen, beziehungsweise der Kontrolle in dem selben Zeitpunkte in je 3 Zuchtgläsern gezählt. In den Tabellen sind diese Werte und die Abweichungswerte zusammengefaßt. Die Zellenanzahl bezieht sich auf Milliliter.

# OS 38 35 962

Tabelle 1a

Wirkung der erfindungsgemäßen Substanzen (SZTP-14, SZTP-15, SZTP-16, SZTP-17 und SZTP-18) auf die K-562-Zellenlinie in vitro (Behandlung: mit 1, 10 und 100 µg/ml 24 Stunden nach Verdünnung der Kultur)

	Anzahl × 10 <sup>3</sup> /ml Nährflüssigkeit		
	48 Stunden	72 Stunden	96 Stunden
<b>SZIP-14</b>			
100 µg/ml	0	0	0
10 µg/ml	90	90	150
	110	80	120
	70	80	140
1 µg/ml	80	170	180
	100	180	190
	100	120	150
Kontrolle	130	220	260
	120	230	230
	110	220	230
<b>SZIP-15</b>			
100 µg/ml	40	10	10
50	20	10	
20	10	20	
10 µg/ml	80	100	160
	60	120	110
	50	100	140
1 µg/ml	120	150	200
	100	140	190
	120	120	210
Kontrolle	140	210	270
	120	190	250
	150	190	280
<b>SZIP-16</b>			
100 µg/ml	100	160	160
	120	120	140
	100	140	140
10 µg/ml	120	160	220
	120	160	240
	140	180	240
1 µg/ml	140	180	260
	120	210	280
	140	240	250
Kontrolle	140	220	280
	130	200	260
	140	200	270
<b>SZIP-17</b>			
100 µg/ml	110	180	200
	120	190	210
	110	200	200
10 µg/ml	120	200	260
	120	200	260
	120	190	280
1 µg/ml	150	260	280
	130	210	280
	130	210	260
Kontrolle	140	250	280
	150	220	280
	130	220	260

	Anzahl $\times 10^3$ /ml Nährflüssigkeit			
	48 Stunden	72 Stunden	96 Stunden	
SZIP-18				5
100 $\mu\text{g/ml}$	100	160	180	
	100	130	180	
	90			
120	190	230		
1 $\mu\text{g/ml}$	140	200	280	10
	140	210	260	
	130	220	280	
Kontrolle	140	220	280	
	150	230	280	15
	140	230	270	

Ein völliger Zerfall wurde nach einer Dosis von 100  $\mu\text{g/ml}$  beobachtet, was auf eine effektive dosisabhängige Wirkung hinweist.

Tabelle 1b

Wirkung der Vergleichssubstanzen H-17 und K-17 auf die Proliferation der K-562-Zellen in vitro (Behandlung: mit 1, 10 und 100  $\mu\text{g/ml}$  24 Stunden nach der Verdünnung der Kultur)

	Anzahl $\times 10^3$ ml Nährflüssigkeit			
	48 Stunden	72 Stunden	96 Stunden	
H-17				30
100 $\mu\text{g/ml}$	125	230	280	
	110	210	270	
	120	210	280	
10 $\mu\text{g/ml}$	120	220	290	35
	130	240	280	
	125	210	220	
1 $\mu\text{g/ml}$	130	240	290	
	120	240	290	40
	120	220	270	
K-17				
100 $\mu\text{g/ml}$	120	220	280	
	110	210	290	
	120	220	270	45
10 $\mu\text{g/ml}$	125	240	290	
	135	240	290	
	120	210	270	
1 $\mu\text{g/ml}$	140	240	290	50
	120	220	280	
	120	230	280	
Kontrolle	120	210	290	
	130	200	280	55
	120	220	285	

Tabelle 1c

Wirkung der Vergleichssubstanz A-3 auf die Proliferation der K-562-Zellen in vitro (Behandlung: mit 1, 10 und 100 µg/ml 24 Stunden nach der Verdünnung der Kultur)

		Anzahl × 10 <sup>3</sup> /ml Nährflüssigkeit		
		48 Stunden	72 Stunden	96 Stunden
10	Kontrolle	120	250	300
		120	240	290
		125	240	290
15	100 µg/ml	110	110	100
		120	110	100
		120	120	110
20	10 µg/ml	130	120	120
		120	110	110
		120	110	
25	1 µg/ml	110	110	100
		120	110	110
		120	120	110

## In vivo Prüfungen

a) L<sub>1210</sub>-Tumor; Prüfung der Substanz SZTP-14.

Ursprung des Tumors: Chester Beatty Institute, London.

Tierstamm: eigene DBA/2-Inzuchtsmaus.

Gewicht und Geschlecht der Tiere: 20-23 g; 5 Weibchen in jeder Gruppe,

Anzahl der Tumorzellen: 10<sup>5</sup>/Tier, intraperitoneal (i.p.).

Behandlung: 50 mg/kg i.p. in der 24. Stunde nach der Impfung des Tumors beginnend, einmal täglich, 8 Tage lang.

Kontrollgruppe: 0,2 ml physiologische Kochsalzlösung, i.p.

Auswertung: durch die Anzahl der verendeten Tiere.

Ergebnisse: aus der Tabelle 2 geht hervor, daß die behandelten Tiere die Kontrolltiere überlebten. Während 10 Tage nach Impfung des Tumors kein Kontrolltier lebte, waren alle behandelten Tiere noch am Leben. Das erste behandelte Tier verendete 13 Tage, das letzte 15 Tage nach Impfung des Tumors.

Tabelle 2

Überleben von durch L<sub>1210</sub>-Tumor geimpften, mit 50 mg/kg SZTP-14 behandelten DBA/2-Mäusen bzw. DBA/2-Kontrollmäusen

	Tage nach Impfung	Lebende Kontrollmäuse	Lebende behandelte Mäuse
	9	3	5
	10	—	5
	11	—	5
	12	—	5
	13	—	4
	14	—	3
	15	—	—

## b) Prüfung der Substanz SZTP-14 an der Ascites-Form des P-388 Tumors.

Tierstamm: BDF/1 Hybrid, eigene Inzucht.

Gewicht und Geschlecht der Tiere: Männchen mit 20-23 g Körpergewicht; 5 Tiere in jeder Gruppe.

Anzahl der Tumorzellen: 2,8 × 10<sup>6</sup>/Tier, i.p.

Behandlung: 10 mg/kg i.p. von der 24. Stunde nach der Impfung des Tumors beginnend, einmal täglich, 8 Tage lang. Die Kontrolltiere bekamen gleichzeitig 0,2 ml physiologische Kochsalzlösung, i.p.

Auswertung: Durch die Anzahl der verendeten Tiere

Ergebnisse: aus der Tabelle 3 geht die Anzahl der überlebenden Tiere hervor. Es kann bestätigt werden, daß alle behandelten Tiere die Kontrolltiere überlebten.

Tabelle 3

Überleben von mit P-388 Tumor geimpften, mit 10 mg/kg SZTP-14 behandelten BDF/1-Mäusen bzw. BDF/1-Kontrollmäusen

Tage nach Impfung	Lebende Kontrollmäuse	Lebende behandelte Mäuse
9	4	5
10	—	5
11	—	5
12	—	5
13	—	5
14	—	5
15	—	4
16	—	2
17	—	1
18	—	—

c) Prüfung der Substanz SZTP-14 am Ehrlich-Ascites-Tumor. Tierstamm: Swiss "non-inbred", eigene Zucht. Gewicht und Geschlecht der Tiere: 20 g Körpergewicht, 5 Männchen und 5 Weibchen in jeder Gruppe. Anzahl der Tumorzellen:  $10^6$ /Tier, i.p. Behandlung: 50 mg/kg oder 75 mg/kg i.p., in der 24. Stunde nach der Impfung des Tumors beginnend, einmal täglich, 20 Tage lang. Die Kontrolltiere bekamen 0,2 ml physiologische Kochsalzlösung i.p.

Tabelle 4

Gestaltung des Körpergewichtes von durch Ehrlich-Ascites-Tumor geimpften, mit 50 mg/kg bzw. 75 mg/kg SZTP-14 i.p. 20 Tage lang behandelten, männlichen und weiblichen Swiss-Mäusen bzw. Swiss-Kontrollmäusen am 16. Tage nach der Impfung des Tumors beginnend; durchschnittliches Ausgangs-Körpergewicht: 20 g. O: infolge des Tumors verendet; + : infolge anderer Ursachen verendet.

Tag nach Impfung	Kontrolle ♀					Kontrolle ♂					75 mg/kg ♀				
	1.	2.	3.	4.	5.	1.	2.	3.	4.	5.	1.	2.	3.	4.	5.
16.	43	37	41	46	40	40	34	40	35	41	17	22	24	21	22
17.	44	39	42	46	41	40	35	0	35	42	17	23	24	25	22
18.	45	42	43	47	49	42	35	0	35	43	18	23	24	21	24
19.	0	43	43	50	0	0	36	0	0	44	19	23	24	21	24
20.	0	46	0	42	0	0	42	0	0	46	16	21	23	20	21
21.	0	48	0	43	0	0	47	0	0	47	18	23	25	23	22
22.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	51	19	23	26	29	24
24.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	19	24	26	24	25
25.											20	24	26	24	26
26.											20	24	27	24	25,5
27.											21	25	28	25	26
28.											21	25	28	25	26
29.											21	25	28	25	26
33.											22	25	28	25	26
34.											22	25	28	25	26
42.											23	26	27	25	28
50.											24	27	27	25	28
55.											26	29	0	27	32

## Fortsetzung der Tabelle 4

5	Tag nach Impfung	75 mg/kg O <sup>♂</sup>					50 mg/kg ♀					50 mg/kg O <sup>♂</sup>				
		1.	2.	3.	4.	5.	1.	2.	3.	4.	5.	1.	2.	3.	4.	5.
	16.	28	23	28	25	29	18	19	22	23	+	29	30	31	26	27
	17.	28	23	28	24	28	18	19	22	23	+	28	30	31	26	28
10	18.	29	24	27	25	30	19	20	23	23	+	29	30	32	27	29
	19.	29	24	28	26	30	20	20	23	23	+	29	30	32	28	29
	20.	27	22	25	24	27	17	18	21	21	+	27	28	30	24	27
15	21.	29	23	27	27	29	18	18	22	22	+	27	30	29	25	27
	22.	29	24	28	27	30	20	20	24	22	+	29	30	32	25	29
	24.	29	25	29	28	31	20	20	24	23	+	29	30	32	26	30
20	25.	30	26	30	29	31	21	21	24	24	+	30	30	32	26	31
	26.	30	25	30	29	31	22	22	24	25	+	30	31	32	26	31
	27.	30,5	26	31	30	31	22	22	25	25	+	30	31	32	25	32
25	28.	31	26	31	30	31	22	22	25	25	+	30	31	31	25	32
	29.	31	26	31	30	31	22	22	25	25	+	30	31	32	26	32
	33.	30	27	32	31	32	23	22	27	26	+	28	32	30	24	33
	34.	30	27	32	31	32	23	22	30	26	+	28	32	30	24	33
30	42.	32	29	33	34	28	24	25	30	31	+	27	33	30	26	35
	50.	34	30	35	37	24	24	26	30	36		0	34	30	26	36
	55.	33	32	38	0	37	26	28	32	43	+	0	36	31	27	38

## Auswertung:

durch stetiges Messen des Körpergewichtes und Beobachtung der Verendungen. Am 55. Tage nach der Impfung wurden die lebenden behandelten Tiere getötet, sezziert, die Menge des Ascites wurde bestimmt und die eventuelle Bildung eines festen Tumors registriert.

## Ergebnisse:

Tabelle 4 zeigt die Körpergewichtsänderung der Mäuse von dem 16. Tage nach Impfung des Tumors. Es ist erstaunlich, daß alle Kontrollmäuse zwischen dem 17. und 22. Tage verendeten; der große Gewichtsüberschuß ergibt sich aus der hohen Menge des tumorösen Ascites. In allen Gruppen der behandelten Tiere lebten die Tiere — mit der Ausnahme einer Maus in jeder Gruppe — noch am 55. Tage nach der Impfung des Tumors. In diesem Zeitpunkt wurden die Mäuse getötet. Die Menge des intraabdominalen Ascites und die Anwesenheit eines festen Tumors sind in Tabelle 5 angegeben. Daraus ist es ersichtlich, daß kein Tier im Augenblicke des Abtötens tumorfrei war, aber 16 Tiere von 20 behandelten Tiere am 33. Tage nach dem Verenden der letzten Kontrollmaus noch lebten.

Tabelle 5

Ascites und fester Tumor in der Bauchhöhle von mit Ehrlich-Ascites-Tumorzellen geimpften, mit 50 mg/kg bzw. 75 mg/kg SZTP-14 behandelten, am 55. Tag des Versuches getöteten Swiss-Mäusen.

## Behandlung

	75 mg/kg ♀					75 mg/kg O <sup>♂</sup>					50 mg/kg ♀					50 mg/kg O <sup>♂</sup>				
Ascites ml	-	-	0	-	4	1	6	-	0	-	-	5	2	4	0	-	1	-	4	0
Fester intraabdominaler Tumor	+	+	0	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	0

0: das Tier verendete früher

+: in der Bauchhöhle wurde fester Tumor gefunden

## Hemmung von Tumormetastasen durch die Substanz SZTP-14

## a) Lewis-Lungentumor (LLT)

Tierstamm: LATI C<sub>57</sub>Bl Maus-Inzucht.

Gewicht und Geschlecht der Tiere: 4 behandelte und 6 Kontrolltiere mit 20-23 g Körpergewicht (Weibchen).

Anzahl der Tumorzellen:  $5 \times 10^6$  LLT-Zellen i.p. in die Milz geimpft.

Behandlung: 75 mg/kg 8 Tage lang nach der Impfung des Tumors.

Auswertung: durch die Anzahl der Lebermetastasen nach der Abtötung der Tiere.

Ergebnisse: die Anzahl der Metastasen ist in Tabelle 6 angegeben. Es ist ersichtlich, daß sich kein Tumor nach der Behandlung mit SZTP-14 bildete.

Tabelle 6

Anzahl der Lebermetastasen 8 Tage nach der Impfung von LLT-Zellen in die Milz von weiblichen C<sub>57</sub>-Bl-Mäusen und Kontrollmäusen (Behandlung täglich mit 75 mg/kg SZTP-14 i.p.)

Anzahl der Lebermetastasen	
Kontrolle	31 20 63 36 38 56 ( $\bar{x} = 40,66$ ; $s = 16,02$ ; $n = 6$ )
SZTP-14	0 0 0 0 (n = 4)

## b) Lewis-Lungentumor mit intramuskulärer Impfung, Zählung der Lungenmetastasen,

Tierstamm: 5 weibliche C<sub>57</sub>Bl-Mäuse in jeder Gruppe.Anzahl der Tumorzellen:  $5 \times 10^5$ /Tier intramuskulär, in die Muskulatur des rechten Oberschenkels. Nach 10 Tagen wurde die tumoröse Extremität amputiert und die Behandlung wurde von dem 11. bis zum 17. Tage täglich mit 50 mg/kg i.p. ausgeführt. Die Kontrolltiere bekamen 0,2 ml physiologische Kochsalzlösung i.p.

Auswertung: Die Tiere wurden am 18. Tage getötet und die Anzahl der Metastasen und das durchschnittliche Volumen der Metastasen unter einem Stereomikroskop bestimmt.

Tabelle 7

Anzahl der Lungenmetastasen 18 Tage nach der Impfung von LLT-Zellen und 8 Tage nach Entfernung des primären Tumors in C<sub>57</sub>-Bl-Mäusen und Kontrollmäusen (Behandlung: täglich mit 50 mg/kg SZTP-14 i.p. zwischen den 11. und 17. Tagen)

Behandlung	Durchschnittliche Anzahl der Metastasen	Durchschnittliches Volumen der Metastasen (mm <sup>3</sup> )
Kontrolle	63,13 $\pm$ 27,53	49,45 $\pm$ 29,07
SZIP-14	26,29 $\pm$ 18,87	20,10 $\pm$ 35,38

## Demonstration der antiviralen Wirkung

## Hemmung der Synthese des Tabakmosaikvirus

Unter normalen Treibhausbedingungen wurden intakte, gegen die Infektion durch das Tabakmosaikvirus empfindliche Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun) mechanisch inokuliert (infiziert). Zur Infizierung wurde Carborundum-Pulver mit einer Teilchengröße von 500 mesh verwendet. Das Inokulum enthielt 200 µg/ml Tabakmosaikvirus (U1 Stamm) in einem 0,1 m Phosphatpuffer (Sörensen-Phosphatpuffer, pH 7,2). Die intakten Blätter wurden 3 Stunden nach der Infizierung durch Sprühen behandelt. Die Behandlungen wurden täglich einmal an drei aufeinanderfolgenden Tagen wiederholt. 2 Wochen nach der Inokulation wurde die Intensität der Symptome der systematischen Infektion beurteilt und Proben wurden von allen Blattniveaus der Pflanze, d. h. von den in verschiedenen Höhen stehenden Blättern, genommen, die dementsprechend verschiedenen Alters waren. Der Virusgehalt wurde aus 1 g gefrorener Probe bestimmt. Die Blattproben wurden in einer Reibschale mit 4 ml Sörensen-Puffer (pH 7,2) homogenisiert, dann in Eppendorf-Röhren 5 Minuten mit einer Drehzahl von 10 000/Minute zentrifugiert. Zur quantitativen Virusbestimmung wurden 15 ml der überstehenden Flüssigkeit (Supernatant) verwendet. Der Virusgehalt wurde durch "Rocket"-Immunelektrophorese mittels eines virusspezifischen Antigens (anti-TMV U1; 1 µl IgG/cm<sup>2</sup>) bestimmt. Das Entwicklungsmittel war eine 0,2 m Natriumbarbiturat-Barbitursäure-Pufferlösung. Die Viruskonzentration wurde aufgrund der Standard-Kalibrationskurve aus der Höhe der Präzipitations-Bogenlinien berechnet.



Tabelle 8

## Bestimmung des Virusgehaltes

	Behandlung: mit SZIP-14	Virusgehalt
5		
	200 mg/l	11 mg/ml
	20 mg/l	24,66 mg/ml
	2 mg/l	29,30 mg/ml
10	0 (Kontrolle)	51,33 mg/ml

Die erfindungsgemäßen Polyisodiaminocarbonsäuren können als Arzneimittelwirkstoffe sowohl in Form der freien Basen als auch in Form ihrer nicht toxischen pharmazeutisch brauchbaren Salze als Arzneimittelpräparate vorliegen. Diese können in an sich bekannter Weise durch Vermischen mit den bei der Arzneimittelbereitung üblichen Träger- und/oder Hilfsstoffen erhalten werden.

Erfindungsgemäße Polyisodiaminocarbonsäuren als Wirkstoffe enthaltende Arzneimittelpräparate können beispielsweise Injektionslösungen, Tabletten, Dragees, Suppositorien, Suspensionen, Trinklösungen und Pulvergemische sein.

Die als Arzneimittelwirkstoff wirksame Menge der erfindungsgemäßen Polyisodiaminocarbonsäuren hängt vom Verabreichungsweg und vom Zustand des Kranken ab. Im allgemeinen beträgt die tägliche Dosis 0,02 bis 20 mg/kg Körpergewicht, die in 2 bis 4 Teildosen verabreicht wird. Im Falle der oralen Verabreichung werden höhere Dosen verwendet.

Bevorzugte Arzneimittelformen sind die Injektionslösungen, die auf intravenösem, subkutanem oder intramuskulärem Weg verabreicht werden. Zur Herstellung von Injektionslösungen werden eine isotonische Kochsalzlösung, gegebenenfalls ein Phosphatpuffer sowie Ascorbinsäure als Stabilisierungsmittel gebraucht.

Weitere Beispiele für Arzneimittelformen sind solche zur oralen Verabreichung in fester oder flüssiger Form. Im Falle von flüssigen Formen können Süßungsmittel und/oder Geschmackskorrigentien als Teil der pharmazeutisch brauchbaren Verdünnungsmittel vorliegen. Vorteilhafte feste Dosiseinheiten zur oralen Verabreichung sind zum Beispiel Tabletten, Dragees und Kapseln. Zur Herstellung dieser Formen wird beziehungsweise werden der beziehungsweise die Wirkstoff(e) mit dem beziehungsweise den üblichen pharmazeutischen Träger und/oder Hilfsstoff(en) vermischt und das Gemisch wird zu Tabletten gepreßt, zu Dragees umgewandelt oder in Kapseln gefüllt. Als Trägerstoffe können übliche Füll- und/oder Zusatzmaterialien, wie Milchzucker, Magnesiumstearat, Saccharose, Talk, Stearinsäure, Gelatine, Agar, Pektin, Tragant, kolloidale Kieselsäure, Maisstärke und/oder Alginsäure dienen. Der Bereitung der Suppositorien dient vorzugsweise Kakaobutter.

Ferner können die erfindungsgemäßen Polyisodiaminocarbonsäuren sowohl in Form der freien Basen als auch in Form ihrer Salze in Pflanzenschutzmittelpräparaten vorliegen.

Diese können in an sich bekannter Weise durch Vermischen mit den im Pflanzenschutz üblichen Träger- und Hilfsstoffen erhalten werden. Diese dienen in erster Linie der Erhöhung der Resistenz der Pflanzen gegen Virusinfektionen.

Die festen oder flüssigen Präparate zur Behandlung von Pflanzen werden zweckmäßig in der Weise bereit, daß die erfindungsgemäßen Polyisodiaminocarbonsäuren mit üblichen Träger- und/oder Zusatzstoffen, zum Beispiel Kaolin und/oder Netzmitteln, vorteilhaft mit anderen Wirkstoffen kombiniert, vermischt werden. Aus diesen Präparaten können Lösungen oder Suspensionen, welche die erfindungsgemäßen Polyisodiaminocarbonsäuren in Konzentrationen 0,0001 bis 0,005 Gew.-% [1 bis 50 ppm], vorzugsweise 0,0005 bis 0,0015 Gew.-% [5 bis 15 ppm], enthalten, bereit werden. Diese können in üblicher Weise, zweckmäßig in Aufwandmengen von 0,5 bis 5 g/ha, ausgebracht werden.

Die Erfindung wird an Hand der folgenden Beispiele näher erläutert.

## Beispiel 1

 $\epsilon$ -Poly-L-lysin-hydrobromida) N $\alpha$ -Benzyloxycarbonyl-L-lysin-p-nitrophenylesterhydrochlorid

10 g N $\alpha$ -Benzyloxycarbonyl-(N $\epsilon$ -tert.-butyloxycarbonyl)-L-lysin-p-nitrophenylester werden in 40 ml Trifluoressigsäure gelöst und eine äquivalente Menge von 2n salzsaurer Ethylacetat-Lösung wird zugegeben. Nach 1 Stunde langem Stehenlassen wird die Lösung auf die Hälfte eingedampft und Ether wird zugegeben. Das Produkt wird mit einer Ausbeute von 8,3 g (96,06%) gewonnen, Schmp.: 83–86°C, R $_f$  = 0,68 (n-Butanol-Eisessig/Wasser 4 : 1 : 1 Vol./Vol.).

b) N $\alpha$ -Benzyloxycarbonyl-N $\epsilon$ -(N $\alpha$ -benzyloxycarbonyl-N $\epsilon$ -tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl)-L-lysin-p-nitrophenylester

7,69 g (20 mmol) N $\alpha$ -Benzyloxycarbonyl-(N $\epsilon$ -tert.-butyloxycarbonyl)-L-lysin werden in abs. Acetonitril gelöst und eine äquivalente Menge von Triethylamin (2,0 ml) und dann Isobutylchlorformiat (2,8 ml) werden zugegeben. Nach Aktivierung werden 9 g gemäß a) hergestelltes Salz und gleichzeitig eine Lösung einer äquivalenten Menge Triethylamin (2,8 ml) in Acetonitril zugegeben. Das Produkt wird durch Eingießen des Reaktionsgemischs

sches in Wasser gewonnen und aus dem Gemisch von Ethylacetat und Petrolether umkristallisiert. So werden 12,9 g (89,02%) Produkt erhalten, Schmp.: 128—131 °C. Nach der Analyse enthält es 99,8% —ONp.

$R_f = 0,64$  (Ethylacetat/Cyclohexan 3 : 1 Vol./Vol.)

$R_f = 0,91$  (n-Butanol/Eisessig/Wasser 4 : 1 : 1 Vol./Vol.)

HPLC:  $t_R = 8,8$  Minuten ( $k' = 2,2$ )

Säule: ODS-Hypersil-6 (125 × 4 mm)

Eluent: Methanol/Acetonitril/0,02 m Natriumacetat, pH 4,0, 40 : 30 : 30 Vol./Vol.

Geschwindigkeit: 1 ml/Minute

Nachweis: durch UV bei 254 nm

5

#### c) $N^\alpha$ -Benzyloxycarbonyl- $N^\epsilon$ -( $N^\alpha$ -benzyloxycarbonyl-L-lysyl)-L-ysin-p-nitrophenylester-hydrochlorid

10

Ein Salz wird aus 10,5 g  $N^\alpha$ -Benzyloxycarbonyl- $N^\epsilon$ -( $N^\alpha$ -benzyloxycarbonyl- $N^\epsilon$ -tert.-butyloxycarbonyl-L-lysyl)-L-ysin-p-nitrophenylester gemäß a) hergestellt. Die Ausbeute beträgt 10,25 g (98%), Schmp. 109—113 °C,  $R_f = 0,70$  (n-Butanol/Eisessig/Wasser 4 : 1 : 1 Vol./Vol.).

15

#### d) $N^\epsilon$ -tert.-Butyloxycarbonyl-tri( $N^\alpha$ -benzyloxycarbonyl-L-ysin)-p-nitrophenylester

Ein gemischtes Anhydrid wird aus 5,71 g (15 mmol)  $N^\alpha$ -Benzyloxycarbonyl-( $N^\epsilon$ -tert.-butyloxycarbonyl)-L-ysin mit der äquivalenten Menge von Triethylamin und mit Isobutyl-chlorformiat in Acetonitril gemäß b) bereitet. Zu dieser Lösung werden 10,5 g Salz von  $N^\alpha$ -Benzyloxycarbonyl- $N^\epsilon$ -( $N^\alpha$ -benzyloxycarbonyl-L-lysyl)-L-ysin-p-nitrophenylester in der Anwesenheit von Triethylamin gegeben. Nach Aufarbeitung gemäß b) werden 13,9 g Produkt erhalten, das aus dem Gemisch von Acetonitril und Ether umkristallisiert wird. Dieses Produkt schmilzt bei 145—150 °C und enthält nach der Analyse 99,6% —ONp;

20

$R_f = 0,98$  (n-Butanol/Eisessig/Wasser 4 : 1 : 1 Vol./Vol.);

25

HPLC:  $t_R = 18,2$  Minuten,  $k' = 8,1$ ;

Säule: ODS-Hypersil-6 (125 × 4 mm);

Eluent: Methanol/Acetonitril/0,02 m Natriumacetat-Puffer (pH 4) 40 : 30 : 30 Vol./Vol.; 1 ml/Minute;

Nachweis: mittels UV bei 254 nm.

30

#### e) Tri-( $N^\alpha$ -Benzyloxycarbonyl-L-ysin)-p-nitrophenylester-hydrochlorid

12,2 g Ester [hergestellt nach d)] werden gemäß a) behandelt. So werden 12,1 g (95,4%) Salz gewonnen, Schmo.: 108—125 °C,  $R_f = 0,71$  (n-Butanol/Eisessig/Wasser 4 : 1 : 1 Vol./Vol.).

35

#### f) $\epsilon$ -Poly- $[N^\alpha$ -benzyloxycarbonyl-L-ysin]

23 g (24 mmol) Tri( $N^\alpha$ -Benzyloxycarbonyl-L-ysin)-p-nitrophenylester-hydrochlorid werden in 60 ml abs. Dimethylsulfoxid, in der Anwesenheit von 4,5 ml Triethylamin bis zur völligen Gelbildung polykondensiert. Das Polymer wird durch Eingießen in Sodalösung isoliert. So werden 16,8 g (89,6%) Polymer erhalten. Analyse:  $Z_{CO_2}$  berechnet: 16,3%; gefunden: 16,8%;  $[\eta_{sp}]/c = 31,92$  ml/g<sup>2</sup> ( $c = 4,95$  g/l, Dichloressigsäure).

40

#### g) $\epsilon$ -Poly-L-ysin-hydrobromid [Polyiso-L-ysin-hydrochlorid]

Zur Lösung von 16 g geschütztem Polymer in 100 ml Trifluoressigsäure werden 100 ml 4 n essigsäure Hydrobromidlösung gegeben. Durch Eingießen der einen Niederschlag enthaltenden Lösung in Ether gewinnt man das Endprodukt in einer Ausbeute von 14,7 g (91,6%). Analyse: Br berechnet: 37,7%; gefunden: 36,8%.  $A_{254\text{ nm}} = 0$ . Papierchromatographie auf W1 mit dem Entwicklungsmittel n-Butanol/Eisessig/Pyridin/Wasser 30 : 6 : 24 : 20 Vol./Vol.).

45

Die Ausbeute beträgt 36,82% von dem geschützten Monomer bis zu dem Polymer und 18,85% von freiem Lysin ausgehend. Das Molekulargewicht der derart erhaltenen Polymere liegt zwischen 5500 und 20 300 Dalton.

50

#### h) Reinigung des Rohproduktes

Die wäßrige Lösung von 250 mg gemäß g) erhaltenem Polymer wird auf einer Sephadex G-50 (fine) Säule (80 × 4 cm) gelchromatographiert. Destilliertes Wasser, 0,9 gew.-%ige Kochsalzlösung oder 0,1 n Salzsäure werden als Eluent verwendet. Die Fraktionen von 1 ml werden bei 220 nm nachgewiesen.

55

#### i) Reinigung des Rohproduktes

60

20 ml Ethanol werden zur wäßrigen Lösung von 2 g gemäß g) bereiteten  $\epsilon$ -Poly-L-ysin-hydrobromid in 2 ml Wasser gegeben und nach Verreiben werden 80 ml Ether zugegeben und damit wird gefällt. Der Ether wird durch Dekantieren zweimal gewechselt. Nach Kühlung über Nacht wird das Gemisch filtriert, mit Ether gewaschen und getrocknet. So werden 1,26 g (83%) Produkt erhalten. Die Ausbeute beträgt 57,7% auf das geschützte Ausgangs-Tripeptid berechnet.

65

In dieser Weise wurden auch die folgenden Verbindungen hergestellt:

SZTP-14: Molekulargewicht 12 700 Dalton auf die freie Base berechnet,  $[\alpha]_D^{25} + 32,4^\circ$  ( $c=2$ ,  $H_2O$ ),

SZIP-15: Molekulargewicht  $11\,600 \pm 200$  Dalton,  $[\alpha]_D^{25} + 31,9^\circ$ .

SZIP-16: Molekulargewicht  $13\,400 \pm 200$  Dalton,  $[\alpha]_D^{25} + 32,6^\circ$ .

SZIP-17: Molekulargewicht  $14\,500 \pm 200$  Dalton,  $[\alpha]_D^{25} + 32,1^\circ$ .

#### Beispiel 2

##### $\epsilon$ -Poly-L-lysin-hydrochlorid

Die Lösung von 1 g Polymer (hergestellt wie im Beispiel 1) in 40 ml 2m Natriumchlorid-Lösung wird zuerst gegen 2m Natriumchloridlösung, darauffolgend gegen Wasser dialysiert. Die Substanz wird durch Lyophilisierung gewonnen.

#### Beispiel 3

##### $\epsilon$ -Poly-L-lysin (freie Base)

Eine Säule wird aus 40 ml Dowex 1-Anionenaustauschharz bereitet, welches im  $OH^-$ -Zyklus ist. Die Lösung von 1 g Polymer (hergestellt wie im Beispiel 1) in 20 ml Wasser läßt man durch diese Säule mit einer Geschwindigkeit von 1 ml/Minute durchfließen. Die Fraktionen mit einem basischen pH-Wert werden vereinigt und lyophilisiert.

#### Beispiel 4

##### $\epsilon$ -Poly-D-lysin-hydrobromid

Aus 10 g ( $N^\alpha$ -Benzyloxycarbonyl)-( $N^\epsilon$ -tert.-butyloxycarbonyl)-D-lysin-p-nitrophenylester bekommt man 1,3 g freies Polymer durch Anwendung des Verfahrens von Beispiel 1; Molekulargewicht: 8900 Dalton;  $[\alpha]_D^{25} - 47,08^\circ$  ( $c=0,92$ ,  $H_2O$ ).

#### Beispiel 5

##### $\delta$ -Poly-L-ornithin

Gemäß der Methode des Beispiels 1 werden 10 g  $N^\alpha$ -Benzyloxycarbonyl-( $N^\delta$ -tert.-butyloxycarbonyl)-L-ornithin-p-nitrophenylester zu 7,9 g  $N^\alpha$ -Benzyloxycarbonyl-L-ornithin-p-nitrophenylester-hydrochlorid umgesetzt, das bei  $87-90^\circ C$  schmilzt. Dieses Salz wird mit  $N^\alpha$ -Benzyloxycarbonyl-( $N^\delta$ -tert.-butyloxycarbonyl)-L-ornithin gemäß Beispiel 1b) zu  $N^\alpha$ -Z- $N^\delta$ -( $N^\alpha$ -Z- $N^\delta$ -tert.-butyloxycarbonyl-L-ornithinyl)-L-ornithin-p-nitrophenylester-Dipeptid gekoppelt, welches in einer Ausbeute von 12,1 g erhalten wird, Schmp.:  $133-136^\circ C$ . Durch Wiederholung des Verfahrens des Beispiels 1a) werden aus diesem Dipeptid 11,99 g  $N^\alpha$ -Z- $N^\delta$ -( $N^\alpha$ -Z-ornithinyl)-L-ornithin-p-nitrophenylester-hydrochlorid Schmp.:  $115-119^\circ C$  gewonnen, und daraus werden 14,8 g  $N^\delta$ -Boc-tri( $N^\alpha$ -Z-L-ornithin)-p-nitrophenylester durch die Koppelung gemäß Beispiel 1b) hergestellt, Schmp.:  $150-153^\circ C$ . Darauffolgend wird gemäß dem Beispiel 1e) Tri( $N^\alpha$ -Z-L-ornithin)-p-nitrophenylester-Salz, Schmp.:  $115-130^\circ C$ , bereitet, und 22 g von diesem Salz werden gemäß dem Beispiel 1f) in Dimethylsulfoxid polykondensiert. So werden 15,4 g (87,6%)  $\delta$ -Poly-( $N^\alpha$ -benzyloxycarbonyl-L-ornithin) gewonnen, das nach einer Behandlung gemäß dem Beispiel 1g) 13,1 g (93%)  $\delta$ -Poly-L-ornithin-hydrobromid gibt.

#### Beispiel 6

##### $\delta$ -Poly-D-ornithin-hydrobromid

Das im Beispiel 5 beschriebene Verfahren wird verwendet, mit dem Unterschied, daß 1 g  $N^\alpha$ -Benzyloxycarbonyl-( $N^\delta$ -tert.-butyloxycarbonyl)-D-ornithin-p-nitrophenylester als Ausgangssubstanz verwendet wird. So werden 1,2 g (89%) Titelverbindung als Hydrobromid erhalten.

#### Beispiel 7

##### $\gamma$ -Poly-(L- $\alpha,\gamma$ -diaminobuttersäure)

Entsprechend der Methode des Beispiels 1 werden 9,8 g  $N^\alpha$ -Benzyloxycarbonyl-( $N^\epsilon$ -tert.-butyloxycarbonyl)-L- $\alpha,\gamma$ -diaminobuttersäure-p-nitrophenylester zu 6,9 g  $N^\alpha$ -Benzyloxycarbonyl-L- $\alpha,\gamma$ -diaminobuttersäure-p-nitrophenylester-hydrochlorid umgesetzt, das bei  $67-70^\circ C$  schmilzt. Dieses Salz wird gemäß dem Beispiel 1b) mit  $N^\alpha$ -Benzyloxycarbonyl-( $N^\gamma$ -tert.-butyloxycarbonyl)-L- $\alpha,\gamma$ -diaminobuttersäure zu  $N^\alpha$ -Z- $N^\gamma$ -( $N^\alpha$ -

Z-N<sup>γ</sup>-tert.-butyloxycarbonyl- $\alpha,\gamma$ -diaminobutyl)-L- $\alpha,\gamma$ -diaminobuttersäure-p-nitrophenylester-Dipeptid gekoppelt. Dieses Produkt wird mit einer Ausbeute von 10,8 g erhalten, Schmp.: 125–127°C. Durch Wiederholung des Verfahrens des Beispiels 1a) gelangt man von diesem Dipeptid zu 10,35 g N<sup>α</sup>-Z-N<sup>γ</sup>-(N<sup>α</sup>-Z-L- $\alpha,\gamma$ -diaminobutyl)-L- $\alpha,\gamma$ -diaminobuttersäure-p-nitrophenylester-hydrochlorid, Schmp.: 108–112°C, welches dann durch eine im Beispiel 1b) beschriebene Koppelung 13,7 g N<sup>γ</sup>-Boc-tri(N<sup>α</sup>-Z-L- $\alpha,\gamma$ -diaminobuttersäure)-p-nitrophenylester ergibt, Schmp.: 143–145°C. Diese letztere Verbindung wird gemäß dem Beispiel 1e) zu Tri(N<sup>α</sup>-Z-L- $\alpha,\gamma$ -diaminobuttersäure)-p-nitrophenylester-Salz umgesetzt, Schmp.: 105–110°C, dessen 10,5 g gemäß dem Beispiel 1f) in Dimethylsulfoxid polykondensiert wird. So werden 7,8 g  $\gamma$ -Poly-(N<sup>α</sup>-benzyloxycarbonyl-L- $\alpha,\gamma$ -diaminobuttersäure) erhalten (Ausbeute 86,5%) und daraus werden gemäß dem Beispiel 1g) 6,2 g (90,5%)  $\gamma$ -Poly-(L- $\alpha,\gamma$ -diaminobuttersäure)-hydrobromid gewonnen.

#### Beispiel 8

##### $\beta$ -Poly-(L- $\alpha,\beta$ -diaminopropionsäure)

Gemäß dem Beispiel 1 werden 7,1 g N<sup>α</sup>-Benzyloxycarbonyl-L- $\alpha,\beta$ -diaminopropionsäure-p-nitrophenylester-hydrochlorid, Schmp. 65–67°C, aus 9,6 g N<sup>α</sup>-Benzyloxycarbonyl-[N<sup>β</sup>-tert.-butyloxycarbonyl)-L- $\alpha,\beta$ -diaminopropionsäure-p-nitrophenylester erhalten. Das erhaltene Salz wird mit N<sup>α</sup>-Benzyloxycarbonyl-(N<sup>β</sup>-tert.-butyloxycarbonyl)-L- $\alpha,\beta$ -diaminopropionsäure gemäß dem Beispiel 1b) zu N<sup>α</sup>-Z-N<sup>β</sup>-(N<sup>α</sup>-Z-N<sup>β</sup>-tert.-butyloxycarbonyl)-L- $\alpha,\beta$ -diaminopropionyl)-L- $\alpha,\beta$ -diaminopropionsäure-p-nitrophenylester-Dipeptid gekoppelt. Die Ausbeute dieser Koppelung ist 11,0 g, das Produkt schmilzt bei 119–122°C. Durch Wiederholung des Verfahrens von Beispiel 1a) gelangt man aus diesem Dipeptid zu N<sup>α</sup>-Z-N<sup>β</sup>-(N<sup>α</sup>-Z-L- $\alpha,\beta$ -diaminopropionsäure-p-nitrophenylester-hydrochlorid mit einer Ausbeute von 10,65 g Schmp.: 102–105°C. Durch Koppelung dieser letzten Substanz gemäß dem Beispiel 1b) werden 12,6 g N<sup>β</sup>-Boc-tri(N<sup>α</sup>-Z-L- $\alpha,\beta$ -diaminopropionsäure)-p-nitrophenylester erhalten, Schmp.: 138–140°C. Daraus wird Tri(N<sup>α</sup>-Z-L- $\alpha,\beta$ -diaminopropionsäure)-p-nitrophenylester-Salz gemäß dem Beispiel 1e) bereitet, Schmp.: 102–106°C, Ausbeute 12,4 g. 12,4 g dieses Produktes werden in Dimethylsulfoxid gemäß dem Beispiel 1f) polykondensiert. So werden 8,7 g (90,2%)  $\beta$ -Poly-(N<sup>α</sup>-benzyloxycarbonyl-L- $\alpha,\beta$ -diaminopropionsäure) gewonnen, welches nach einer Behandlung gemäß dem Beispiel 1g) 5,6 g (88,7%)  $\beta$ -Poly-(L- $\alpha,\beta$ -diaminopropionsäure)-hydrobromid ergibt.

#### Beispiel 9

##### Einen erfindungsgemäßen Wirkstoff enthaltende Injektionslösung

500 mg  $\epsilon$ -Poly-L-lysin-hydrobromid werden in 10 ml physiologischer Kochsalzlösung gelöst, und die Lösung wird steril filtriert. Die so erhaltene Injektionslösung wird in einer täglichen Dosis von 1 bis 100 mg/kg von dem Zustand des Kranken abhängig verabreicht.

#### Beispiel 10

##### Einen erfindungsgemäßen Wirkstoff enthaltende Tablettenkomposition

Tabletten werden aus den folgenden Komponenten hergestellt:

10 g Polyiso-L-lysin-hydrochlorid  
60 g Lactose  
16 g Saccharose  
20 g Maisstärke  
2 g Magnesiumstearat  
2 g Alginsäure

Die Komponenten werden homogenisiert und das Gemisch wird zu 100 Tabletten gepreßt.

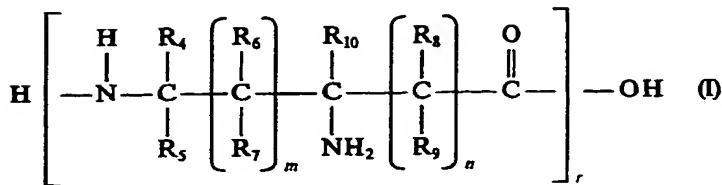
#### Beispiel 11

##### Verfahren zur Erhöhung der Resistenz von Pflanzen gegen Virusinfektion

100 Liter wäßrige Lösung werden aus 5 g Polyiso-L-lysin hergestellt, dessen pH-Wert durch Zugabe von einer Natriumhydroxidlösung auf 7,0 bis 7,2 eingestellt wird; dann wird 1 ml Tween 20 Netzmittel zugegeben. Die so erhaltene Lösung wird nach dem Auflaufzustand der Pflanzen auf ein Gebiet von 1 Hektar ausgebracht.

#### Patentansprüche

##### 1. Polysodiaminocarbonsäuren der allgemeinen Formel



worin

$\text{R}_4, \text{R}_5, \text{R}_6, \text{R}_7, \text{R}_8, \text{R}_9$  und  $\text{R}_{10}$  unabhängig voneinander für Wasserstoff beziehungsweise Alkylreste mit 1 bis 4 Kohlenstoffatom(en) stehen,

$r$  ein Durchschnittswert von 10 bis 400 ist,

$m$  eine Zahl von 0 bis 10 bedeutet und

$n$  eine Zahl von 0 bis 10 darstellt,

sowie ihre Salze, optischen Isomere und Racemate.

2. Polyisodiaminocarbonsäuren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß

$m$  eine Zahl von 0 bis 3 ist und/oder

$n$  0 bedeutet.

3. Polyisodiaminocarbonsäuren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß der beziehungsweise die Alkylrest(e), für welche  $n$   $\text{R}_4, \text{R}_5, \text{R}_6, \text{R}_7, \text{R}_8, \text{R}_9$  und/oder  $\text{R}_{10}$  stehen kann beziehungsweise können, [ein] solche  $r$  mit 1 oder 2 Kohlenstoffatom(en) ist beziehungsweise sind.

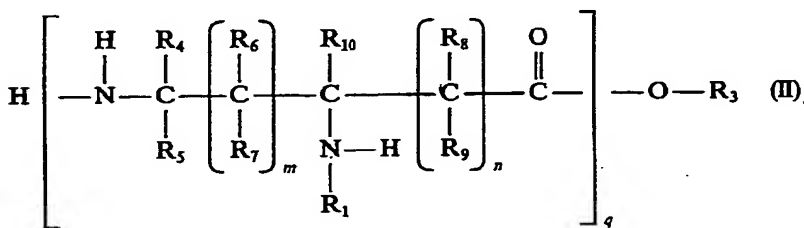
4. Polyisodiaminocarbonsäuren nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß  $r$  eine Zahl von 40 bis 200 bedeutet.

5. Polyisodiaminocarbonsäuren nach Anspruch 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß sie die L-Konfiguration haben.

6. Polyisoolysin mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 5 500 bis 25 600 Dalton.

7. Polyisooronithin mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 4400 bis 13 500 Dalton.

8. Verfahren zur Herstellung der Verbindungen nach Anspruch 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß man geschützte Monomere oder Oligomere mit [einer] Diaminosäureeinheit(en) der allgemeinen Formel



worin

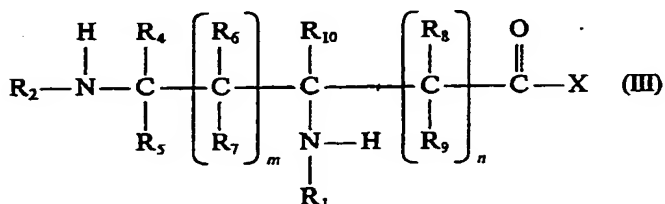
$q$  eine Zahl von 1 bis 9 bedeutet,

$\text{R}_1$  für eine Aminoschutzgruppe steht und in Oligomeren in einer jeden Oligomereinheit gleich ist,

$-\text{O}-\text{R}_3$  für eine dem Schutz und der gleichzeitigen Aktivierung der Carboxylgruppe dienende Aktivester-Schutzgruppe steht,

$\text{R}_4, \text{R}_5, \text{R}_6, \text{R}_7, \text{R}_8, \text{R}_9, \text{R}_{10}, m$  und  $n$  die im Anspruch 1 bis 3 angegebenen Bedeutungen haben,

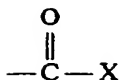
wobei im Falle von Oligomeren die Bedeutungen der Substituenten in den einzelnen Gliedern gleich oder verschieden sind, mit geschützten monomeren Diaminosäurederivaten der allgemeinen Formel



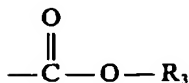
worin

$\text{R}_2$  für eine von  $\text{R}_1$  verschiedene, gegenüber  $\text{R}_1$  selektiv entfernbare Aminoschutzgruppe steht,

$\text{X}$  eine zur Aktivierung der Carboxylgruppe dienende Gruppe mit der Maßgabe, daß die Gruppe der allgemeinen Formel

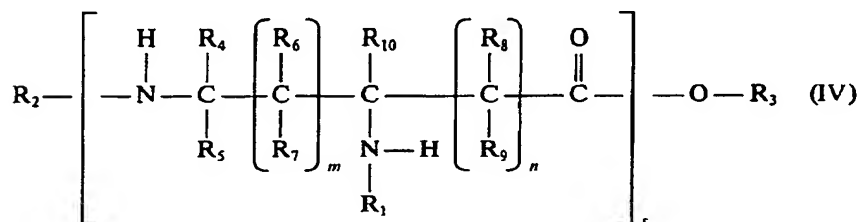


reaktionsfähiger als die Gruppe der allgemeinen Formel



ist, bedeutet und

$\text{R}_1, \text{R}_4, \text{R}_5, \text{R}_6, \text{R}_7, \text{R}_8, \text{R}_9, \text{R}_{10}$   $m$  und  $n$  die vorstehend angegebenen Bedeutungen haben, umgesetzt, aus den so erhaltenen geschützten Oligo- beziehungsweise Polyisodiaminocarbonsäuren der allgemeinen Formel



worin

$\text{R}_1, \text{R}_4, \text{R}_5, \text{R}_6, \text{R}_7, \text{R}_8, \text{R}_9, \text{R}_{10}$   $m$  und  $n$  die vorstehend angegebenen Bedeutungen haben und  $s$  eine ganze Zahl von 2 bis 10 ist,

die Aminoschutzgruppe  $\text{R}_2$  absplaltet und aus den erhaltenen geschützten Oligo- beziehungsweise Polyisodiaminocarbonsäuren, im Falle daß  $s$  2 bis 9 bedeutet, nach ihrem Umsetzen mit geschützten monomeren Diaminosäurederivaten der allgemeinen Formel III und/oder Polykondensierten die Schutzgruppen  $\text{R}_1$  absplattet, worauf man in an sich bekannter Weise gegebenenfalls die erhaltenen Polyisodiaminocarbonsäuren der allgemeinen Formel I in Säureadditionssalze überführt beziehungsweise gegebenenfalls die erhaltenen Säureadditionssalze der Polyisodiaminocarbonsäuren der allgemeinen Formel I in die freien Polyisodiaminocarbonsäuren oder in andere Säureadditionssalze überführt und/oder gegebenenfalls eine Spaltung der erhaltenen racemischen Polyisodiaminocarbonsäuren der allgemeinen Formel I beziehungsweise Salze derselben in ihre optisch aktiven Antipoden beziehungsweise eine Racemisierung der entsprechenden optisch aktiven Verbindungen vornimmt.

9. Verfahren nach Anspruch 8 zur Herstellung von Polyisodiaminocarbonsäuren der allgemeinen Formel I, bei welchen

$m$  3 bedeutet und

$n$  0 ist,

dadurch gekennzeichnet, daß man als geschützte Monomere oder Oligomere mit [einer] Diaminosäureeinheit(en) der allgemeinen Formel II solche,

bei welchen

$m$  3 bedeutet und

$n$  0 ist,

einsetzt und als geschützte monomere Diaminosäurederivate der allgemeinen Formel II solche,

bei welchen

$m$  3 bedeutet und

$n$  0 ist,

verwendet.

10. Verfahren nach Anspruch 8 zur Herstellung von Polyisodiaminocarbonsäuren der allgemeinen Formel I, bei welchen

$m$  2 bedeutet und

$n$  0 ist,

dadurch gekennzeichnet, daß man als geschützte Monomere oder Oligomere mit [einer] Diaminosäureeinheit(en) der allgemeinen Formel II solche,

bei welchen

$m$  2 bedeutet und

$n$  0 ist,

einsetzt und als geschützte monomere Diaminosäurederivate der allgemeinen Formel III solche,

bei welchen

$m$  2 bedeutet und

$n$  0 ist,

verwendet.

11. Verfahren nach Anspruch 8 oder 9 zur Herstellung von Polyiso-L-lysinen, dadurch gekennzeichnet, daß man als geschütztes Monomer mit [einer] Diaminosäureeinheit(en) der allgemeinen Formel II N<sup>α</sup>-Z-L-Lysin-p-nitrophenylester-hydrochlorid und als geschütztes monomeres Diaminosäurederivat der allgemeinen Formel III ein gemischtes Anhydrid, welches aus N<sup>α</sup>-Z-N<sup>ε</sup>-Boc-L-lysin mit Isobutyl-chlorformiat erhalten worden ist, verwendet.

12. Verfahren nach Anspruch 8 oder 10 zur Herstellung von Polyiso-L-ornithinen, dadurch gekennzeichnet, daß man als geschütztes Monomer mit [einer] Diaminosäureeinheit(en) der allgemeinen Formel II N<sup>α</sup>-Z-L-Ornithin-p-nitrophenylester-hydrochlorid und als geschütztes monomeres Diaminosäurederivat der allgemeinen Formel III ein gemischtes Anhydrid, welches aus N<sup>α</sup>-Z-N<sup>β</sup>-Boc-L-Ornithin mit Isobutyl-chlorformiat erhalten worden ist, verwendet.

13. Verfahren nach Anspruch 8 oder 9 zur Herstellung von Polyiso-D-lysinen, dadurch gekennzeichnet, daß man als geschütztes Monomer mit [einer] Diaminosäureeinheit(en) der allgemeinen Formel II N<sup>α</sup>-Z-D-Lysin-p-nitrophenylester-hydrochlorid und als geschütztes monomeres Diaminosäurederivat der allgemeinen Formel III ein gemischtes Anhydrid, welches aus N<sup>α</sup>-Z-N<sup>ε</sup>-Boc-D-Lysin mit Isobutyl-chlorformiat erhalten worden ist, verwendet.

14. Verfahren nach Anspruch 8 oder 10 zur Herstellung von Polyiso-D-ornithinen, dadurch gekennzeichnet, daß man als geschütztes Monomer mit [einer] Diaminosäureeinheit(en) der allgemeinen Formel II N<sup>α</sup>-Z-D-Ornithin-p-nitrophenylester-hydrochlorid und als geschütztes monomeres Diaminosäurederivat der allgemeinen Formel III ein gemischtes Anhydrid, welches aus N<sup>α</sup>-Z-N<sup>β</sup>-Boc-D-Ornithin mit Isobutyl-chlorformiat erhalten worden ist, verwendet.

15. Arzneimittel, gekennzeichnet durch einen Gehalt an 1 oder mehr Verbindung(en) nach Anspruch 1 bis 7 als Wirkstoff(en), gegebenenfalls zusammen mit 1 oder mehr üblichen pharmazeutischen Träger- und/oder Hilfsstoff(en).

16. Pflanzenschutzmittel, insbesondere zur Erhöhung der Resistenz von Pflanzen gegen Virusinfektionen, gekennzeichnet durch einen Gehalt an 1 oder mehr Verbindung(en) nach Anspruch 1 bis 7, gegebenenfalls zusammen mit 1 oder mehr in Pflanzenschutzmitteln üblichen Träger- und/oder Hilfsstoff(en).